Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 427- 439

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر - آبان ۱۴۰۱ ص.۴۳۹-۴۲۷

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

Identification and evaluation of the prebiotic effect of water-soluble polysaccharides extracted from green almond hull

Rezvan Shaddel[1*], Safoura Akbari-Alavijeh[1]

Received: 2021.07.28
Revised: 2021.10.12
Accepted: 2021.11.13
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Shaddel, R., Akbari-Alavijeh, S. (2022). Identification and evaluation of the prebiotic effect of water-soluble polysaccharides extracted from green almond hull. Iranian Food Science and Technology Research Journal. 18 (4), 427-439.

Abstract

Introduction: Today, the incidence of non-communicable and emerging diseases is increasing due to lifestyle changes, reduced mobility and changing dietary patterns. Some clinical evidences in simulated samples and real cases show that some compounds and plant extracts have a significant effect on the prevention and even treatment of these diseases. On the other hand, due to the structural and functional diversity of plant polysaccharides, there is a great tendency among researchers to find new polysaccharides in different sources with new functional and bioactive properties. Despite extensive studies in this field, no study has been done on the extraction of polysaccharide compounds with prebiotic properties from green almond hull as one of the agricultural wastes. Therefore, the purpose of this study was to introduce a new type of synbiotic compound to balance clone microbiota and promote consumer health.

Materials and methods: In this study, after extraction of water-soluble almond hull polysaccharides (AHP) by hot water extraction and precipitation with alcohol, the chemical analysis was done. To investigate the chemical composition of AHP, phenol sulfuric acid test was used to measure total sugar and Bradford test was used to measure protein. The amount of fat and ash in the sample was measured using standard methods (AOAC, 2005) and (AOAC, 2000), respectively. The amount of uronic acid of AHP was measured by calorimetry using metahydroxyphenyl at a wavelength of 520 nm. The content of AHP phenolic compounds was investigated by Folin Siocalcu calorimetric method. Fourier transform infrared (FT-IR) was also used to identify the functional groups and the anomeric status of AHP components. The prebiotic effect of this compound was also tested by digestion resistance and also by growth stimulation of the probiotic strain of *Lactobacillus casei* ATCC 393 *in vitro* for the first time.

Results and discussion: Chemical analysis showed that AHP is a heteropolysaccharide consisting of 86.30% w/w of total sugar, 5.10% w/w protein and 3.21% w/w uronic acid. FT-IR analysis also confirmed the chemical structure of AHP as a heteropolysaccharide. The results of digestion resistance showed that 91.24% of AHP can remain stable and undecomposed after the stages of gastrointestinal digestion, while this rate was 74.94% for inulin as a commercial prebiotic. The second prebiotic property of AHP investigated in this study was the stimulation the growth of *Lactobacillus casei* ATCC 393 as probiotic in sugar-free MRS-based culture media and the results showed that AHP compared to inulin significantly increased the survival of *Lactobacillus casei* ATCC 393 ($p < 0.01$). The proliferation index in media containing AHP and inulin showed a significant difference and AHP stimulated the growth of *Lactobacillus casei* ATCC

1. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
(*Corresponding Author Email: r.shaddel@uma.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.71662.1075

393 significantly more than inulin ($p < 0.01$). Therefore, to design a synbiotic product, if AHP is used as a prebiotic, the probiotic strain of *Lactobacillus casei* ATCC 393 would be a good choice.

Considering the annual production of thousands of tons of almond green hull waste in Iran and the concerns related to environmental problems caused by its accumulation, the introduction of industrially feasible and economically justified methods to produce value-added products from this agricultural waste seems essential. In the present study, polysaccharides extracted from almond green hull by hot water extraction and alcohol precipitation, which is an economically feasible method and can be implemented on an industrial scale, were introduced as a useful compound. *In vitro* studies also used culture medium containing AHP as a commercial prebiotic in comparison with culture medium containing inulin. The results showed that this compound has a good resistance to digestive conditions in the gastrointestinal tract compared to inulin. The compound was also able to stimulate the growth of the probiotic *Lactobacillus casei* ATCC 393 in culture medium. In general, in this study, a new synbiotic compound including *Lactobacillus casei* ATCC 393 and AHP was introduced as a health beneficial food additive.

Keywords: Probiotics, Prebiotics, Almond hull polysaccharides, *Lactobacillus casei* ATCC 393.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 427- 439

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۴۳۹-۴۲۷

مقاله علمی-پژوهشی

شناسایی و بررسی اثر پریبیوتیکی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب استخراج شده از پوسته سبز بادام

رضوان شاددل[1]*- صفورا اکبری علویجه[1]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۶
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۷/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۲

چکیده

هدف از اجرای این تحقیق معرفی نوعی ترکیب سینبیوتیک جدید در جهت متعادل‌سازی میکروفلور کلون و ارتقا سلامت مصرف‌کننده بود. بدین منظور، پس از استخراج پلی‌ساکاریدهای محلول در آب پوسته سبز بادام (AHP) به روش استخراج با آب داغ و رسوب‌دهی با الکل و شناسایی آن، اثر پریبیوتیکی این ترکیب با تست مقاومت به هضم و همچنین همراه با سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 به روش برون‌تنی برای اولین بار بررسی شد. آنالیز شیمیایی نشان داد که AHP یک هتروپلی‌ساکارید متشکل از ۸۶/۳۰٪ وزنی- وزنی قند کل، ۵/۱۰٪ وزنی- وزنی پروتئین و ۳/۲۱٪ وزنی- وزنی اسید اورونیک است. آنالیز تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR) نیز ساختار شیمیایی AHP را به‌عنوان یک هتروپلی‌ساکارید تایید کرد. نتایج تست مقاومت به هضم نشان داد که ۹۱/۲۴٪ از AHP می‌تواند به‌صورت ثابت و تجزیه نشده پس از طی مراحل هضم گوارشی باقی بماند در حالی که این میزان برای اینولین به‌عنوان یک پریبیوتیک تجاری ۷۴/۹۴٪ به‌دست آمد. دومین خصوصیت پریبیوتیکی AHP که در این مطالعه بررسی شد تحریک رشد پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 در محیط کشت پایه MRS بدون قند بود و نتایج نشان داد که AHP نسبت به اینولین به‌طور معناداری زنده مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 را افزایش داد ($p<0.01$). به‌طور کلی در این تحقیق ترکیب سینبیوتیک جدید شامل *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 و AHP به‌عنوان یک افزودنی فراسودمند در مواد غذایی معرفی شد.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، پریبیوتیک، پوسته سبز بادام، *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393.

مقدمه

امروزه غذا علاوه بر برآورده کردن نیاز های اولیه بدن به‌عنوان یک عامل کلیدی درتأمین سلامتی انسان در نظر گرفته می‌شود، از این‌رو مبحث غذاهای فراسودمند بخش قابل توجهی از مطالعات حوزه صنعت غذا را به‌خود اختصاص داده است. این غذاها می‌بایست علاوه بر ارزش تغذیه‌ای، دارای فواید مشخصی برای سلامتی انسان باشند. در بین انواع غذاهای فراسودمند، غذاهای حاوی پروبیوتیک‌ها و پریبیوتیک‌ها بسیار مورد توجه واقع شده‌اند که به دلیل اثرات فیزیولوژیکی فراوان اثبات شده در مورد آنها است.

پروبیوتیک‌ها طبق تعریف تأیید شده توسط انجمن علمی بین المللی پروبیوتیک و پریبیوتیک (ISAPP[2]) در سال ۲۰۱۴ میکروارگانیسم های زنده‌ای (باکتری یا مخمر) هستند که می‌بایست از نظر متابولیکی در محصول ثابت و فعال باقی بمانند، در طول مسیر قبل از مرحله هضم به تعداد زیاد زنده مانده، خود را به سلول‌های اپیتلیال[3] روده برسانند و آثاری سودمند را در روده میزبان باقی گذارند (Hill et al., 2014). کار اصلی پروبیوتیک‌ها و پریبیوتیک‌ها اصلاح فلور میکروبی روده بزرگ و به دنبال آن اثرات مثبت بر عملکرد کل بدن انسان است.

امروزه در کنار کار بر روی شناسایی سویه‌های پروبیوتیک، محققان بدنبال استراتژی‌هایی جهت تشویق رشد این باکتری‌ها در روده بزرگ نیز بوده‌اند. راهکار مؤثر برای تشویق رشد پروبیوتیک‌ها، غنی‌سازی غذا با پریبیوتیک‌ها است. پریبیوتیک‌ها ترکیبات غذایی غیرقابل هضمی هستند که از طریق تحریک انتخابی رشد و فعالیت یک یا تعدادی از باکتری‌های روده بزرگ بر سلامتی میزبان اثر می‌گذارند. کربوهیدرات

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
* - نویسنده مسئول: Email: r.shaddel@uma.ac.ir

DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.71662.1075
2 International scientific association of probiotics and prebiotics
3 Epithelial cells

های غیرقابل هضم (الیگوساکاریدها و پلی‌ساکاریدها)، برخی پروتئین‌ها و پپتیدها و بعضی لیپیدهای خاص به‌عنوان پریبیوتیک مطرح هستند (Biedrzycka & Bielecka, 2004). اثرات پریبیوتیکی یک ماده غذایی براساس میزان تأثیر آن بر رشد باکتری‌های مفید مانند لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتر، کاهش پاتوژن‌های روده‌ای و افزایش یا کاهش تولید متابولیت‌های میکروبی ارزیابی می‌شود (Grootaert et al., 2007).

بسیاری از ترکیبات پریبیوتیک مؤثر بر سلامتی به‌طور معمول در برخی مواد غذایی و یا منابع گیاهی خوراکی وجود دارند، ولی عدم سهولت مصرف برخی منابع گیاهی، عدم مطابقت ذائقه‌ای و یا محدودیت‌های فصلی و منطقه‌ای، امکان مصرف عمومی آنها را محدود می‌سازد. لذا به‌نظر می‌رسد جداسازی این ترکیبات از منابع جدید و شناسایی و ارزیابی خصوصیات آنها و اضافه کردن آنها به مواد غذایی، استفاده از اثرات سلامتی‌بخش آنها را امکان‌پذیر می‌سازد. پلی ساکاریدهای پریبیوتیک از منابع مختلف مانند گیاهان، برخی قارچها یا علف‌ها و گیاهان دریایی جداسازی شده و خصوصیات زیست فعال آنها مورد ارزیابی قرار گرفته است (Dawood et al., 2021; do Nascimento Santos et al., 2021; Huang et al., 2019; Jayamanohar et al., 2019; Wichienchot et al., 2011; Zhu et al., 2020).

در این تحقیق استخراج پلی‌ساکاریدهای زیست فعال از پوسته سبز بادام مورد توجه قرار گرفته است. سالیانه هزاران تن از بقایای فرآیند پوست گیری در کارخانجات فرآوری بادام در سراسر کشور تولید می شود، که بخش عمده آن به ضایعات کشاورزی تبدیل شده و می‌تواند سبب آلودگی شدید محیط زیست گردد. البته این ماده برای خوراک دام نیز قابل استفاده است، اما به‌دلیل وجود مواد ضدتغذیه‌ای از جمله ترکیبات فنولی که سبب کاهش قابلیت گوارش‌پذیری علوفه، اختلالات رشد و یا ابتلا به بیماری در دام می‌گردد، مصرف آن به صورت محدود و با احتیاط است. بنابراین پوسته سبز بادام به‌عنوان یکی از انواع ضایعات کشاورزی با حجم بالا به جزء مفیدی برای استفاده‌های بیشتر تبدیل شده است. ترکیب شیمیایی پوسته سبز بادام در جدول زیر ارائه شده است (Elahi et al., 2017).

جدول ۱- ترکیب شیمیایی پوسته سبز بادام بر حسب گرم بر ۱۰۰ گرم ماده خشک (Elahi et al., 2017)

Table 1- Chemical composition of almond green hull in grams per 100 grams of dry matter (Elahi et al., 2017)

Percentage درصد	Components اجزاء تشکیل دهنده
90.08	**Organic matter** **ماده آلی**
9.92	**Ash** **خاکستر**
10.34	**Crude protein** **پروتئین خام**
6.71	**Crude fat** **چربی خام**
30.35	**Fibers insoluble in neutral detergent** **الیاف نامحلول در شوینده خنثی**
61.89	**Fibers insoluble in acidic detergent** **الیاف نامحلول در شوینده اسیدی**
41.20	**Total phenolic compounds** **کل ترکیبات فنولی**
14.13	**Non-fibrous carbohydrates** **کربوهیدرات غیر فیبری**

در این تحقیق بررسی اثر پریبیوتیکی ناشی از پلی‌ساکارید استخراج شده از پوسته سبز بادام و پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 به روش برون‌تنی برای اولین بار صورت می‌گیرد. در مطالعات برون‌تنی از بستر محیط کشت حاوی ترکیبات پریبیوتیک استخراج شده در مقایسه با محیط کشت حاوی گلوکز (کنترل منفی) و اینولین (کنترل مثبت) استفاده شد.

مواد و روش‌ها

پوسته سبز بادام سفید (محبعلی) که به صورت آفتابی خشک شده بودند، از روستای مارکده (اصفهان، ایران) در مهرماه سال ۹۸ در دو مرحله تهیه شد و به دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. اینولین از شرکت اورافتی (Orafti HPX، بلژیک) تهیه شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک (آلمان) و سیگما (امریکا) تهیه شدند.

استخراج پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از پوسته سبز بادام

پوسته‌های سبز بادام خشک شده توسط آسیاب برقی پودر شده و با الک شماره مش ۳۰ الک شدند. سپس از الکل ۸۰٪ به‌منظور حذف چربی، قندهای آزاد و ترکیبات فنولیک و رنگی استفاده شد. سپس ترکیبات حل شده در الکل توسط صافی از جنس پارچه نایلونی جدا و مواد باقیمانده بر روی صافی، برای حذف بقایای چربی، قندها و ترکیبات فنولی با الکل تازه شستشو شد و در آون (Wolf، انگلستان) خشک گردید. سپس، پلی‌ساکاریدهای محلول در آب به روش Tadayoni و همکاران (۲۰۱۵) با استفاده از آب داغ و رسوب‌دهی با اتانول استخراج شد (Tadayoni et al., 2015). استفاده از این فرآیند به سبب استفاده از حرارت بالا منجر به دناتوره شدن پروتئین‌ها و بسیاری از ترکیبات حساس به حرارت می‌شود. همچنین بسیاری از پلی‌ساکاریدهای سنگین و نامحلول نیز در حرارت های بالا در آب محلول شده و به فاز آبی وارد می شوند. رسوبات حاصل با سانتریفوژ (سیگما، 6K15، آلمان) تحت شرایط ۲۰۰۰ g و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی شد و برای حذف ناخالصی‌ها، چندین بار با الکل مطلق شستشو داده شدند (Tadayoni et al., 2015). پس از الکل‌زدایی، عصاره حاوی پلی‌ساکاریدهای پوسته سبز بادام[1] ابتدا در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد (Dairei، ژاپن) منجمد و سپس با استفاده از خشک کن انجمادی (Christ Alpha-1-4، آلمان) در دمای ۵۵- درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت خشک شد.

آنالیز شیمیایی و شناسایی ساختار شیمیایی AHP

آنالیز شیمیایی AHP

به‌منظور بررسی ترکیب شیمیایی AHP، از تست فنول سولفوریک اسید برای اندازه گیری قند کل (Jain et al., 2007) و از تست بردفورد برای اندازه‌گیری پروتئین (Wichienchot et al., 2010) استفاده شد. میزان چربی و خاکستر نمونه به‌ترتیب با استفاده از روش‌های AOAC (۲۰۰۵) و AOAC (۲۰۰۰) اندازه‌گیری شد. میزان اورونیک اسید AHP به روش کالری‌متری با استفاده از متاهیدروکسی دیفنیل در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973). محتوای ترکیبات فنولیک AHP با روش کالریمتری فولین سیوکالچو بررسی شد (Taylor et al., 2015).

بازدهی استخراج AHP با استفاده از فرمول ۱ محاسبه شد (Xie et al., 2013):

$$\text{بازده} (\%) = (W_e / W_0) \times 100 \quad (1)$$

W_e: وزن خشک AHP بر حسب گرم.

W_0: وزن خشک پوسته بادام بر حسب گرم.

تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)

پس از مخلوط کردن پودر AHP با پودر بروميد پتاسيم، قرص مورد نیاز با استفاده از دستگاه پرس تهیه شد. طیف‌سنجی مادون قرمز در دامنه طول موج ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ cm^{-1} با استفاده از دستگاه تبدیل فوریه مادون قرمز FTIR (JASCO، ژاپن) ثبت گردید (Tadayoni et al., 2015).

بررسی خصوصیات فراسودمند AHP

مقاومت به هضم AHP

برای بررسی مقاومت به هضم AHP، شبیه‌سازی شیره‌های گوارشی بر اساس روش Jain و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد (Jain et al., 2007). برای شبیه‌سازی فرآیند هضم و شیره‌های گوارشی سه مرحله در نظر گرفته شد:

- بافر ۱ (شبیه‌سازی شیره معده): کلرید سدیم (۲ گرم)، اسید کلریدریک (۷ میلی‌لیتر) (pH= ۱/۲).
- بافر ۲ (شبیه‌سازی مخلوط معده و روده): بافرهای ۱ و۳ به نسبت ۳۹:۶۱ (pH= ۴/۵).
- بافر ۳ (شبیه‌سازی محیط روده): پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (۶/۸ گرم)، سود (۱۹۰ میلی‌لیتر)، آلفاآمیلاز (۲ واحد در هر میلی لیتر) (pH= ۷/۴).

برای بررسی مقاومت به هضم AHP، طی سه مرحله از بافرهای تهیه شده استفاده گردید. ابتدا بافر ۱ به نمونه AHP اضافه گردیده و در انکوباتور شیکردار (۱۰۰ دور در دقیقه)، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت قرار گرفت. پس از یک ساعت نمونه سانتریفوژ شده و از مایع رویی برای اندازه گیری قند آزاد نمونه‌برداری شد. قند آزاد به روش DNS اندازه‌گیری شده و درصد هیدرولیز بر اساس میزان قند آزاد شده نسبت به قند کل گزارش شد. در مرحله دوم بافر شماره ۲ به نمونه اضافه شده و در انکوباتور شیکردار (IKA® KS 4000 i control، آلمان) با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، به مدت یک ساعت قرار گرفت. پس از یک ساعت نمونه سانتریفوژ شده و از مایع رویی برای اندازه گیری قند آزاد نمونه‌برداری شد. در مرحله سوم هضم به بافر ۳ آنزیم آلفاآمیلاز اضافه شده تا مقاومت آن به هیدرولیز آنزیمی نیز ارزیابی شود و در انکوباتور شیکردار (۱۰۰دور در دقیقه)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار گرفت (Wichienchot et al., 2010). پس از گذشت زمان یک ساعت نمونه سانتریفوژ شده و از مایع رویی برای اندازه‌گیری قند آزاد نمونه‌برداری شد. تمام مراحل گفته شده برای اینولین به‌عنوان پریبیوتیک شاخص تجاری نیز انجام شده وکلیه آزمایشات مربوطه با

1 Almond hull polysaccharides (AHP)

سه تکرار انجام شد. برای هر کدام از مراحل گفته شده درصد هیدرولیز به‌عنوان میزان قند احیا به میزان قند کل طبق فرمول ۲ محاسبه گردید (Wichienchot et al., 2010):

۱۰۰× ((قند احیا اولیه–قندکل)/ قند آزاد احیا)= (٪) درصد هیدرولیز (۲)

تحریک رشد پروبیوتیک توسط AHP

لاکتوباسیلوس کازئی ATCC 393 که خصوصیات پروبیوتیکی آن قبلاً به اثبات رسیده است به‌عنوان یک سویه پروبیوتیک شناخته شده تجاری، برای رشد در حضور پلی‌ساکاریدهای مورد مطالعه شامل AHP و اینولین انتخاب شدند.

برای بررسی فعالیت پریبیوتیکی AHP، محیط MRS پایه بدون قند برای رشد سویه پروبیوتیک انتخاب شد. برای آماده‌سازی تیمارهای مختلف، محیط MRS پایه حاوی AHP (w/v ۲٪) در مقایسه با محیط حاوی اینولین (w/v ۲٪)، محیط کنترل مثبت از محیط MRS پایه حاوی گلوکز (w/v ۲٪) و محیط کنترل منفی از محیط MRS پایه بدون قند تهیه شد.

کشت های *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 در محیط کشت حاوی گلیسرول در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. پس از خروج از فریزر تحت شرایط استریل محتویات هر میکروتیوب به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS مایع استریل، منتقل شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۸ ساعت، انکوبه‌گذاری شد. سپس، سویه پروبیوتیک فعال شده به نسبت (v/v) ۲٪ به محیط‌های مذکور اضافه گردید. از محیط های مذکور در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نمونه‌برداری و در شرایط مشابه با فعال‌سازی انکوبه‌گذاری شد. سپس طبق روش Miles و همکاران (۱۹۳۸) کشت و شمارش انجام شد (Miles et al., 1938). pH نمونه‌ها نیز طی هر نمونه‌برداری ثبت شد. همچنین شاخص تکثیر (PI)[1] بین زمان‌های صفر و ۷۲ ساعت با استفاده از فرمول ۳ در مورد هر تیمار محاسبه شد (Wang et al., 2015):

$$PI = \text{Log } B - \text{Log } A \quad (۳)$$

B: تعداد باکتری‌ها در زمان صفر (CFU/mL).

A: تعداد باکتری‌ها در زمان ۷۲ ساعت (CFU/mL).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

کلیه آزمایشات در سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد و داده‌های به‌دست آمده به صورت (انحراف معیار ±میانگین) گزارش شد. داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹) تحلیل گردید. آنالیز واریانس یکطرفه و با آزمون LSD به‌منظور مقایسه میانگین‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

استخراج پلی‌ساکارید از پوسته سبز بادام و بررسی ترکیب شیمیایی آن

ترکیب شیمیایی AHP در جدول ۲ ارائه شده است. میزان قند کل به روش فنول سولفوریک اسید بیانگر خلوص پلی‌ساکارید استخراج شده است. در این مطالعه این میزان ۸۶/۳۰٪ به‌دست آمد که نشان‌دهنده خلوص قابل قبول عصاره استخراج شده است. با توجه به اینکه اغلب پلی‌ساکاریدهای محلول در آب استخراجی از منابع گیاه ساختار پکتینی دارند معمولاً در آنالیز شیمیایی، میزان اورونیک اسید نیز گزارش می‌شود. در این مطالعه، اورونیک اسید، خاکستر، پروتئین، ترکیبات فنولیک و چربی به مقدار اندکی در AHP وجود داشتند که نشان می‌دهد مرحله چربی‌زدایی به‌طور کامل پروتئین، چربی‌ها و ترکیبات فنولیک را حذف نکرده است.

بازده استخراج AHP ۵/۸۵٪ بر حسب وزن خشک پوسته سبز بادام بود. باید توجه داشت که بازده استخراج پلی‌ساکاریدها قابل افزایش است. البته استفاده از پیش تیمارهای اسیدی، قلیایی یا آنزیمی برای افزایش بازده استخراج می‌تواند به‌کار رود اما می‌بایست با احتیاط استفاده شوند زیرا باعث شکستن پلی‌سکاریدها و کاهش خلوص عصاره به‌دست آمده می‌شوند (Carvalho et al., 2009). نتایج به‌دست آمده در این مطالعه با برخی مطالعات مشابه همخوانی داشت. برای مثال، در مطالعه Tadayoni و همکاران (۲۰۱۵) میزان بازده استخراج پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از بلوط ۵٪ و خلوص پلی‌ساکارید به‌دست آمده را ۹۰٪ گزارش شده است. روش استخراج در مطالعه ایشان کاملاً مشابه با این تحقیق بود (Tadayoni et al., 2015). Luo و همکاران نیز (۲۰۰۹) بازده استخراج پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از گیاه *Dendrobium nobile Lindl.* را حدود ۵٪ محاسبه کردند (Luo et al., 2009). Xie و همکاران (۲۰۱۳)، بازده استخراج پلی‌ساکارید جدا شده از برگ‌های گیاه *Cyclocarya paliurus* را ۲/۱۶٪ اعلام کردند و ترکیب شیمیایی آن شامل ۶۴/۸٪ قند کل، ۲۳/۵٪ اورونیک اسید و ۹/۲۶٪ پروتئین بود (Xie et al., 2013).

شناسایی ساختار شیمیایی AHP با طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR)

به‌منظور شناسایی گروه‌های عاملی و وضعیت آنومری اجزای تشکیل‌دهنده AHP از طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز استفاده

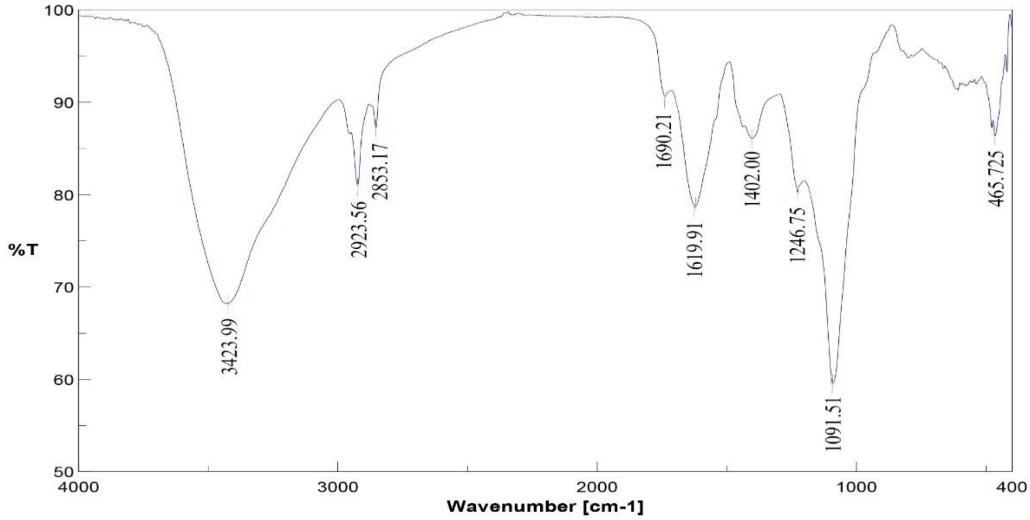
1 Proliferative Index (PI)

شد. این آنالیز در محدوده جذبی ۴۰۰ تا cm^{-1} ۴۰۰۰ انجام شد. همانطور که در شکل ۱ ارائه شده است باند جذبی در cm^{-1} ۳۴۲۳/۹۹ مبین وجود گروه‌های هیدروکسیل در ساختار AHP است و جذب در منطقه cm^{-1} ۲۹۲۳/۵۶ مربوط به ارتعاشات کششی و خمشی در باندهای C-H است (Wang et al., 2015; Zhu et al., 2013). به‌علاوه باندهای جذبی در مناطق cm^{-1} ۱۶۹۰/۲۱ و cm^{-1} ۱۶۱۹/۹۱ مربوط به ارتعاشات کششی باندهای C=O در گروه‌های کربوکسیلیک آزاد و استریفایه شده است که نشان‌دهنده حضور اورونیک اسید در ترکیب AHP است (Nep et al., 2015; Xie et al., 2013). جذب ضعیف در منطقه cm^{-1} ۱۴۰۲/۰۰ مربوط به ارتعاشات خمشی N-H می‌باشد، که مؤید حضور پروتئین در ترکیب AHP است (Wang et al., 2015). باند موجود در cm^{-1} ۱۲۴۶/۷۵ را می‌توان مربوط به ارتعاشات خمشی C-O-H و تغییر شکل‌های کششی باندهای C-H دانست (Tadayoni et al., 2015; Xie et al., 2013). جذب در cm^{-1} ۱۰۹۱/۵۱ مربوط به وجود حلقه پیرانوز است (Luo et al., 2009; Zhu et al., 2013). به‌طور معمول جذب بین ۸۰۰ تا ۱۲۰۰ به‌عنوان منطقه مخصوص پلی‌ساکاریدها در نظر گرفته می‌شود و عمدتاً نمایانگر ساختار سطحی و ایزومرهای مولکول‌های تشکیل‌دهنده آن است (Xie et al., 2013). در مطالعات گذشته نیز طیف‌های مشابهی در مورد پلی‌ساکاریدهای محلول در آب استخراج شده از بلوط (Tadayoni et al., 2015) و *Rosa damascena*، *Calendula officinali* و *Matricaria chamomilla* (Slavov et al., 2016) گزارش شده است. به‌طور کلی طیف تبدیل فوریه مادون قرمز ضمن تأیید نتایج به‌دست آمده قبلی مبین آن است که AHP یک هتروپلی‌ساکارید حاوی اورونیک اسید و پروتئین می‌باشد.

جدول ۲- ترکیب شیمیایی AHP.

Table 2- Chemical composition of AHP.

Components **اجزاء سازنده**	**% W-W** **درصد وزنی- وزنی**
Total sugar **قند کل**	86.30 %
Uronic acid **اورونیک اسید**	3.21%
Ash **خاکستر**	3.08%
Protein **پروتئین**	5.10%
Phenolic compounds **ترکیبات فنولیک**	2.01%
Fat **چربی**	0.3%

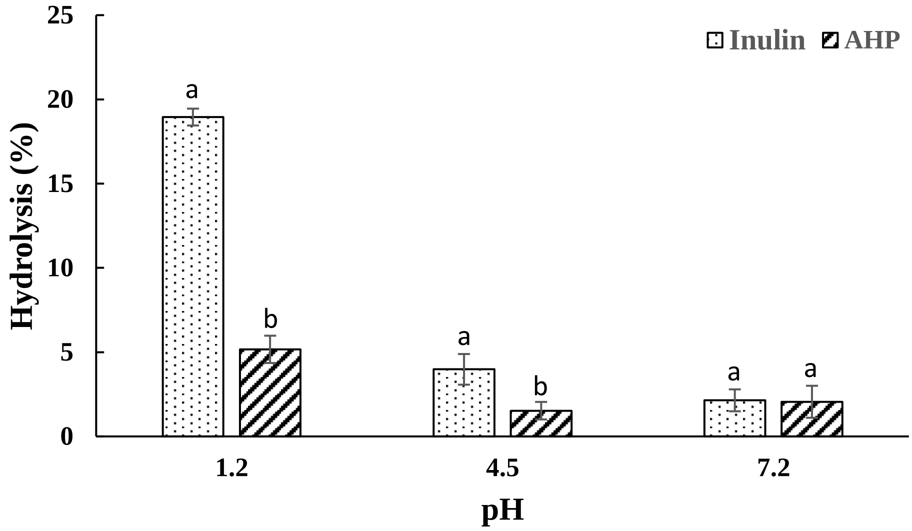


شکل ۱- طیف تبدیل فوریه مادون قرمز AHP.

Fig. 1. FTIR spectra of AHP.

بررسی خصوصیات فراسودمند AHP مقاومت به هضم AHP

اولین قدم برای بررسی قابلیت پریبیوتیکی یک پلی‌ساکارید، مقاومت آن نسبت به اسیدیته دستگاه گوارش و شیره‌های گوارشی است. یک ترکیب پریبیوتیک می‌بایست از قسمت فوقانی لوله گوارش سالم عبور کرده و به روده بزرگ برسد و در آنجا توسط میکروب‌های پروبیوتیک مورد استفاده قرار گیرد. به‌منظور بررسی مقاومت AHP به هضم، ترکیبی از هضم اسیدی و آنزیمی در سه مرحله، شبیه‌سازی شد و درجه هیدرولیز، با اندازه‌گیری میزان قند احیا و قند کل، پس از انجام هضم در مقایسه با مقادیر اولیه به‌دست آمد. همچنین از اینولین به عنوان یک پریبیوتیک شاخص تجاری در کنار نمونه مورد مطالعه استفاده شد. شکل ۲ درصد هیدرولیز AHP را در مراحل مختلف هضم تحت تأثیر بافرهای با pHهای مختلف نشان می‌دهد.



شکل ۲- مقاومت AHP در مراحل مختلف هضم با استفاده از بافرهای با pH های شبیه سازی شده.

Fig. 2 AHP resistance in different stages of digestion using buffers with simulated pHs.

– ab: تفاوت میانگین های دارای حروف غیر مشترک روی ستون مشابه با آزمون LSD در سطح ۱ درصد معنی دار است (p<۰/۰۱).

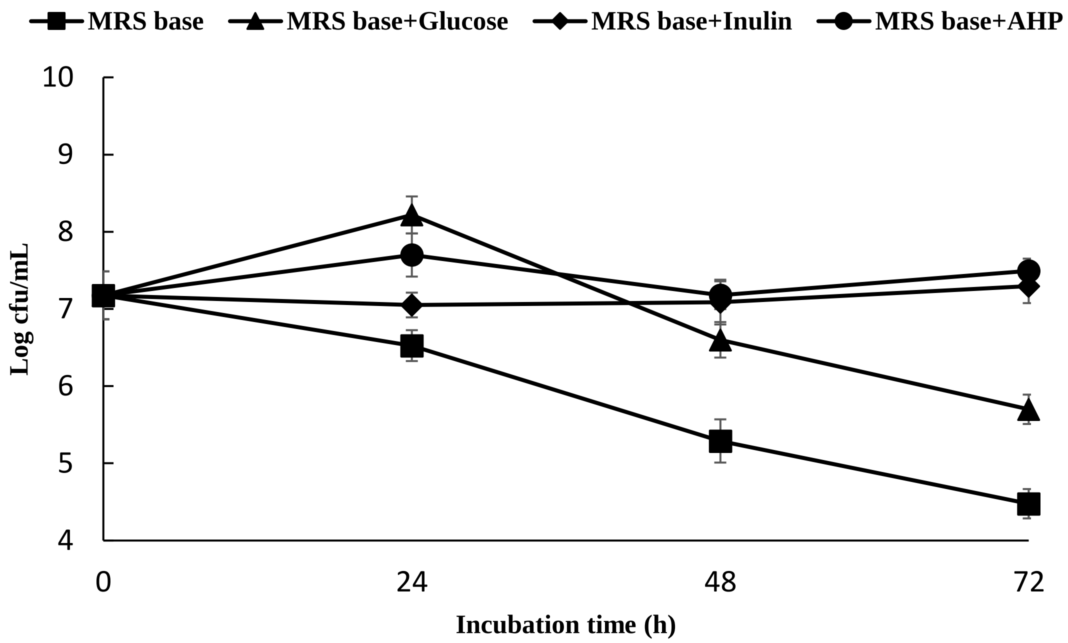
– نتایج، میانگین سه تکرار است.

مطابق با شکل ۲، بافر شبیه سازی شده معده (pH ۱/۲) AHP را به میزان ۰/۸۱ ±۵/۱۷٪ هیدرولیز کرد که به‌طور معناداری از هیدرولیز اینولین در این بافر (۰/۵۰ ±۱۸/۹۵٪) کمتر بود (p<0.01). این پدیده با مطالعات گذشته همخوانی دارد. Gllibowski و Bukowska (۲۰۱۱) نیز تخریب شدید اینولین را تحت pHهای اسیدی (کمتر از ۴) گزارش کردند (Gllibowski & Bukowska, 2011). بافر با pH ۴/۵ AHP را به میزان ۰/۵۲ ±۱/۵۳٪ هیدرولیز کرد، در حالی که اینولین ۰/۹۱ ±۳/۹۷٪ هیدرولیز شد که به‌طور معناداری نسبت به AHP بیشتر بود (p<0.01). در این مرحله پایداری اینولین نسبت به شرایط اسیدی بیشتر بود که مؤید این موضوع است که اینولین نسبت به شرایط نسبتاً اسیدی تا خنثی از نظر شیمیایی مقاوم‌تر است (Gllibowski & Bukowska, 2011). در مرحله سوم هیچ تفاوت معناداری بین درصد هیدرولیز AHP (۰/۹۵ ±۲/۰۶٪) و اینولین (۰/۶۵ ±۲/۱۴٪) مشاهده نشد (p>0.01) که نشان می‌دهد AHP و اینولین هر دو نسبت به شرایط خنثی و آنزیم های گوارشی مقاوم‌اند. نتایج این بخش نشان داد که ۹۱/۲۴٪ از AHP می تواند به صورت ثابت و تجزیه نشده پس از طی مراحل هضم گوارشی شامل عبور از معده و روده کوچک، باقی مانده و خود را به کلون رسانده و توسط فلور میکروبی روده قابل استفاده خواهند بود که این میزان برای اینولین ۷۴/۹۴٪ به‌دست آمد. Wichienchot و همکاران (۲۰۱۱) محدوده وسیعی از مقاومت به هضم اسیدی و آنزیمی را برای تعداد زیادی از پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از میوه‌ها و سبزیجات بومی تایلند گزارش کردند که بسته به تفاوت های ساختاری و منبع استفاده شده، بین ۳۳٪ تا ۷۰٪ بوده است (Wichienchot et al., 2011). آنها همچنین در مطالعه‌ای دیگر حداکثر مقاومت به هضم پلی‌ساکارید استخراج شده از بخش گوشتی گیاه پیتایا را ۴٪ گزارش کردند (Wichienchot et al., 2010). Firdaus و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که پلی‌ساکارید استخراج شده از بامبو بیش از ۹۹ درصد مقاومت به هضم نشان داد (Firdaus et al., 2012). بررسی‌های انجام شده بر روی مقاومت به هضم پلی ساکاریدهای استخراج شده از گیاهان مختلف نشان داده است که میزان

مقاومت آنها در برابر مراحل مختلف هضم به تفاوت‌های ساختاری آنها بر می‌گردد و همین امر مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعات دیگر را مشکل می‌سازد. به‌طور کلی به دلیل پایداری بالای AHP نسبت به اینولین می‌توان نتیجه گرفت که این پلی‌ساکارید به‌عنوان یک عامل پریبیوتیک در غذاهای فراسودمند قابل استفاده است.

تحریک رشد پروبیوتیک توسط AHP

دومین خصوصیت پریبیوتیکی AHP که در این مطالعه بررسی شد تحریک رشد پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 در محیط کشت پایه MRS بدون قند بود که با ۲٪ AHP و یا ۲٪ اینولین به صورت جداگانه غنی‌سازی شده بودند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس تعداد باکتری‌ها و pH محیط کشت در فواصل ۲۴ ساعته به مدت ۷۲ ساعت بررسی گردید. همچنین میزان افزایش جمعیت باکتریایی در طول ۷۲ ساعت تخمیر به‌عنوان شاخص تکثیر محاسبه شد. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می شود، AHP رشد پروبیوتیک مورد مطالعه را بیشتر از اینولین تحریک کرد. محیط کشت پایه MRS که به‌عنوان کنترل استفاده شد محیط مغذی برای سویه پروبیوتیک نبود و جمعیت باکتریایی در طول مدت ۷۲ ساعت بیشترین کاهش را نشان داد. در مورد محیط MRS حاوی گلوکز، در طول ۲۴ ساعت اولیه تخمیر، افزایش جمعیتی بیشتر از محیط‌های حاوی AHP و اینولین مشاهده شد، به دلیل اینکه گلوکز توسط باکتری‌ها به سرعت مصرف می‌شود. اما پس از ۷۲ ساعت جمعیت باکتری‌ها در حضور گلوکز به‌طور قابل توجهی کاهش یافت. در حالی که در محیط‌های حاوی AHP و اینولین کاهش جمعیت با سرعت بسیار کمتری اتفاق افتاد.



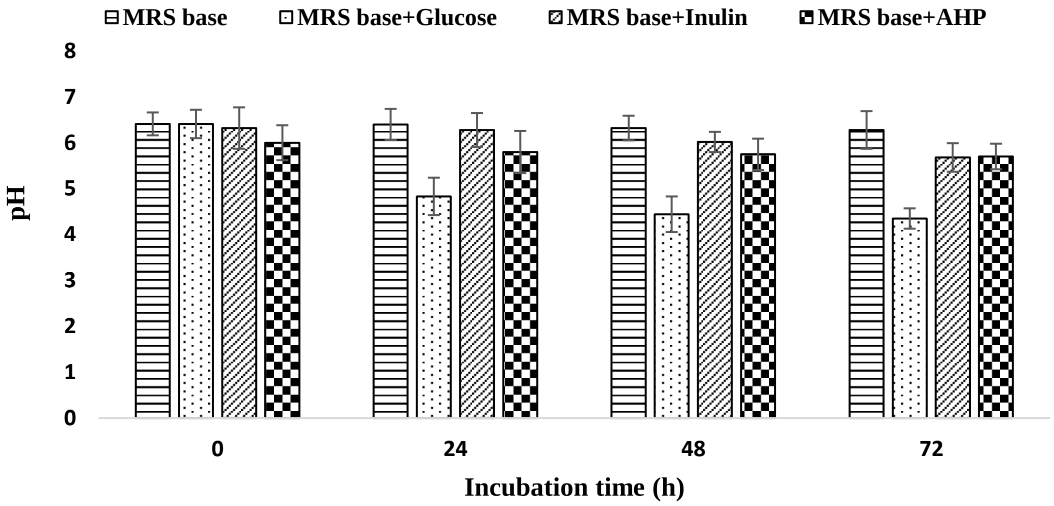
شکل ۳- اثر AHP بر جمعیت *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 در محیط کشت پایه بدون قند در مقایسه با اینولین.
- کنترل منفی: محیط کشت پایه؛ کنترل مثبت: محیط کشت پایه + گلوکز.
- نتایج، میانگین سه تکرار است.

Fig. 3. Effect of AHP on population of *L. casei* ATCC 393 in sugar free MRS base medium compared to inulin.
-Negative control: MRS base; Positive control: MRS base + Glucose.
-Results are the average of three replicates (Mean ± SD (n=3)).

Tadayoni و همکاران (۲۰۱۵) نیز نتایج مشابهی را در مورد پلی ساکاریدهای استخراج شده از بلوط مشاهده کردند. آنها گزارش کردند که پلی‌ساکاریدهای جدا شده از بلوط نسبت به اینولین رشد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7 را به‌طور معناداری بیشتر تحریک می‌کند (Tadayoni et al., 2015). طبق تعریف Huebner و همکاران (۲۰۰۷) قابلیت پری‌بیوتیکی یک پلی‌ساکارید به تأثیرآن بر رشد و زنده مانی میکروارگانیسم در مقایسه با رشد آن میکروب در محیط حاوی قند ساده مانند گلوکز بر می‌گردد. این موضوع به پیچیدگی ساختاری ترکیبات پری‌بیوتیک و عدم دسترسی به قند ساده در محیط رشد میکروب مربوط می‌شود. در محیط‌های حاوی قند ساده، به دلیل پدیده

مهار کاتابولیکی و به دنبال آن مهار فعالیت آنزیم‌ها رشد میکروب‌ها پس از مدت کوتاهی محدود می‌شود (Huebner et al., 2008). اما در محیط‌های حاوی ترکیبات پریبیوتیک به دلیل پیچیدگی ساختار، تولید آنزیم‌های بیشتر که برای متابولیزه شدن ترکیبات غذایی لازم است در پروبیوتیک‌ها القا شده و به آنها قدرت حفظ ثبات و پایداری می دهد (Firdaus et al., 2012).

همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، روند کاهش pH در محیط غنی شده با گلوکز بر خلاف محیطهای کشت حاوی AHP و اینولین در مورد سویه پروبیوتیک مورد مطالعه سریع‌تر است. نتایج نشان داد که مصرف سریع گلوکز اسیدیته محیط کشت را افزایش می‌دهد که این امر برای رشد میکروارگانیسم‌ها در محیط حاوی گلوکز مطلوب نیست (Huebner et al., 2008). در دسترس بودن قندهای ساده به‌عنوان یک منبع ساده کربن در محیط کشت حاوی گلوکز باعث پدیده مهار کاتابولیکی شده و تولید اسید را در این محیط بیشتر کرده است. تأخیر در متابولیزه شدن AHP و اینولین نیز به دلیل پیچیدگی ساختار آنها بوده که باعث القای مسیرهای متابولیکی متفاوت در حین رشد می‌گردد (Tadayoni et al., 2015). در جدول ۳ شاخص تکثیر پروبیوتیک های مورد مطالعه در محیطهای کشت مختلف ارائه شده است.



شکل ٤- اثر AHP بر میزان اسیدسازی *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 در محیط کشت پایه بدون قند در مقایسه با اینولین.
- کنترل منفی: محیط کشت پایه؛ کنترل مثبت: محیط کشت پایه + گلوکز.
- نتایج، میانگین سه تکرار است.

Fig. 4. Effect of AHP on acidifying activity of *L. casei* ATCC 393 in sugar free MRS base medium compared to inulin.
-Negative control: MRS base; Positive control: MRS base + Glucose.
-Results are the average of three replicates (Mean ± SD (n=3)).

نتایج نشان داد که AHP نسبت به اینولین به‌طور معناداری زنده مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 را افزایش داد ($p<0.01$). شاخص تکثیر در محیطهای حاویAHP و اینولین تفاوت معناداری نشان داد و AHP رشد *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 را به‌طور معناداری بیشتر از اینولین تحریک کرد ($p<0.01$). بنابراین برای طراحی یک محصول سین‌بیوتیک، در صورتی که از AHP به‌عنوان پری‌بیوتیک استفاده شود می‌توان از سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 استفاده کرد. در مطالعات مختلف با توجه به تفاوت در ساختار و مقاومت به هضم متفاوت، تفاوت در محیطهای کشت از لحاظ اجزاء تشکیل‌دهنده، تفاوت گونه‌های پروبیوتیک و دوره زمانی رشد مورد مطالعه و غلظت‌های مختلف مورد بررسی از ترکیب پری بیوتیک، امکان مقایسه نتایج مشکل می‌شود. به همین دلیل در این مطالعه از اینولین به‌عنوان یک پری‌بیوتیک شاخص تجاری استفاده شد تا به همراه نتایج به‌دست آمده در بخش مقاومت به هضم، پری‌بیوتیک بودن AHP اثبات گردد. Wang و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از کلزا رشد برخی سویه‌های پروبیوتیک از قبیل *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، *بیفیدوباکتریوم ادولسنتیس*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *بیفیدوباکتریوم اینفنتیس* را تحریک کرد (Wang et al., 2015). در مطالعه Wichienchot و همکاران (۲۰۱۱) اولیگوساکارید استخراج شده از بخش گوشتی پیتایا توانست رشد *لاکتوباسیلوس دلبروکی* را پس از ۴۸ ساعت به میزان دو سیکل لگاریتمی افزایش دهد. در حالی که در حضور اینولین، تنها یک سیکل

لگاریتمی جمعیت این باکتری بیشتر شد (Wichienchot et al., 2011). در مطالعه Firdaus و همکاران (۲۰۱۲) اثر پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از بامبو بر باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* در مدت زمان ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. آن‌ها مشاهده کردند پلی‌ساکارید مطالعه شده بر زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها اثر مثبت داشته است. به‌طوریکه پس از طی ۷۲ ساعت پروبیوتیک‌های مورد استفاده نسبت به گروه کنترل، جمعیت بیشتری داشتند. مکانیسم پیشنهادی برای اثر پلی‌ساکارید استخراج شده آن است که پیچیدگی ساختار باعث شده مدت زمان طولانی‌تری برای متابولیزه کردن آن لازم باشد و در نتیجه میکروب مدت زمان بیشتری از نظر منبع غذایی تأمین است (Firdaus et al., 2012).

جدول ۳- شاخص تکثیر *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 در محیط های کشت مختلف.

Table 3- Proliferation index of Lactobacillus casei ATCC 393 in different culture media.

Culture media **محیط کشت**	**Proliferation index** **شاخص تکثیر**
MRS base medium **محیط کشت پایه**	-2.70 ±0.12 [d]
MRS base+ Glucose **محیط کشت پایه+ گلوکز**	-1.47 ±0.05 [c]
MRS base+ Inulin **محیط کشت پایه+ اینولین**	0.12 ±0.04 [b]
MRS base+ AHP **محیط کشت پایه+ AHP**	0.31 ±0.07 [a]

– ab: تفاوت میانگین های دارای حروف غیرمشترک با آزمون LSD در سطح ۱ درصد معنی‌دار است (p<0.01).

– نتایج، میانگین سه تکرار است.

–ab: the difference between the averages with non-common letters is significant with the LSD test at the level of 1% (p<0.01).

-Results are the average of three replicates (Mean ± SD (n=3)).

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از پوسته سبز بادام را به روش استخراج با آب داغ و رسوب‌دهی با الکل که روشی مقرون به صرفه از نظر اقتصادی و با قابلیت اجرا در مقیاس صنعتی است، به عنوان یک ترکیب فراسودمند معرفی گردید. در مطالعات برون‌تنی نیز از بستر محیط کشت حاوی AHP در مقایسه با محیط کشت حاوی اینولین به‌عنوان یک پری‌بیوتیک تجاری استفاده شد. نتایج نشان داد که این ترکیب در مقایسه با اینولین نسبت به شرایط هضم در لوله گوارش مقاومت خوبی دارد. همچنین این ترکیب توانست رشد پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 را در محیط کشت تحریک کند. به‌طور کلی در این تحقیق ترکیب سین‌بیوتیک جدید شامل *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 و AHP به‌عنوان یک افزودنی فراسودمند در مواد غذایی معرفی شد.

منابع

1. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (2005). Method of analysis Gaithersburg. *AOAC International, Gaithersburg, MD*, 1–38.
2. Biedrzycka, E., & Bielecka, M. (2004). Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends in Food Science and Technology*, *15*(3–4), 170–175. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.014. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.014
3. Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, *54*(2), 484–489. https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90377-1
4. Carvalho, A. F. U., Portela, M. C. C., Sousa, M. B., Martins, F. S., Rocha, F. C., Farias, D. F., & Feitosa, J. P. A. (2009). Physiological and physico-chemical characterization of dietary fibre from the green seaweed Ulva fasciata Delile. *Brazilian Journal of Biology*, *69*(3), 969–977.
5. Dawood, D. H., Darwish, M. S., El-Awady, A. A., Mohamed, A. H., Zaki, A. A., & Taher, M. A. (2021). Chemical characterization of Cassia fistula polysaccharide (CFP) and its potential application as a prebiotic in synbiotic preparation. *RSC Advances*, *11*(22), 13329–13340.
6. do Nascimento Santos, D. K. D., da Silva Barros, B. R., da Cruz Filho, I. J., Júnior, N. da S. B., da Silva, P. R., do Bomfim Nascimento, P. H., de Lima, M. do C. A., Napoleão, T. H., & de Melo, C. M. L. (2021). Pectin-like

polysaccharide extracted from the leaves of Conocarpus erectus Linnaeus promotes antioxidant, immunomodulatory and prebiotic effects. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, *26*, 100263. https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2021.100263

7. Elahi, M. Y., Kargar, H., Dindarlou, M. S., Kholif, A. E., Elghandour, M. M. Y., Rojas-Hernández, S., Odongo, N. E., & Salem, A. Z. M. (2017). The chemical composition and in vitro digestibility evaluation of almond tree (Prunus dulcis DA Webb syn. Prunus amygdalus; var. Shokoufeh) leaves versus hulls and green versus dry leaves as feed for ruminants. *Agroforestry Systems*, *91*(4), 773–780. https://doi.org/10.1007/s10457-016-9964-5
8. Firdaus, A., Nurul, M., Mustafa, S., Hashim, D., & Manap, Y. A. (2012). Prebiotic Activity of Polysaccharides Extracted from Gigantochloa Levis (Buluh beting) Shoots. *Molecules*, *17*, 1635–1651. https://doi.org/10.3390/molecules17021635
9. Gllibowski, P., & Bukowska, A. (2011). The effect of pH, temperature and heating time on inulin chemical stabilityH. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, *10*(2), 189–196. https://doi.org/10.1007/s00217-004-1098-8
10. Grootaert, C., Delcour, J. A., Courtin, C. M., Broekaert, W. F., Verstraete, W., & Van de Wiele, T. (2007). Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. *Trends in Food Science & Technology*, *18*(2), 64–71. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.08.004
11. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *11*(8), 506–514. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66
12. Huang, F., Liu, H., Zhang, R., Dong, L., Liu, L., Ma, Y., Jia, X., Wang, G., & Zhang, M. (2019). Physicochemical properties and prebiotic activities of polysaccharides from longan pulp based on different extraction techniques. *Carbohydrate Polymers*, *206*, 344–351. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.012
13. Huebner, J., Wehling, R. L., Parkhurst, A., & Hutkins, R. W. (2008). Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, *18*(3), 287–293. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.08.013
14. Jain, S. K., Jain, A., Gupta, Y., & Ahirwar, M. (2007). Design and development of hydrogel beads for targeted drug delivery to the colon. *AAPS PharmSciTech*, *8*(3), 34–41. https://doi.org/10.1208/pt0803056
15. Jayamanohar, J., Devi, P. B., Kavitake, D., Priyadarisini, V. B., & Shetty, P. H. (2019). Prebiotic potential of water extractable polysaccharide from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Lwt*, *101*, 703–710. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.089
16. Luo, A., He, X., Zhou, S., Fan, Y., He, T., & Chun, Z. (2009). In vitro antioxidant activities of a water-soluble polysaccharide derived from Dendrobium nobile Lindl. extracts. *International Journal of Biological Macromolecules*, *45*(4), 359–363. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.07.008
17. Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of Hygiene*, *38*(6), 732–749. https://doi.org/10.1017/S002217240001158X
18. Nep, E. I., Sims, I. M., Morris, G. A., & Kontogiorgos, V. (2015). Evaluation of some important physicochemical properties of starch free grewia gum. *Food Hydrocolloids*, *15*, 77–76. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.016.
19. Slavov, A., Panchev, I., Kovacheva, D., & Vasileva, I. (2016). Physico-chemical characterization of water-soluble pectic extracts from Rosa damascena, Calendula officinalis and Matricaria chamomilla wastes. *Food Hydrocolloids*, *61*, 469–476. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.006
20. Tadayoni, M., Sheikh-Zeinoddin, M., & Soleimanian-Zad, S. (2015). Isolation of bioactive polysaccharide from acorn and evaluation of its functional properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, *72*, 179–184. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.015
21. Taylor, P., Woisky, R. G., & Salatino, A. (2015). control Analysis of propolis : some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, *April*, 37–41. https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961
22. Wang, X., Huang, M., Yang, F., Sun, H., Zhou, X., Guo, Y., Wang, X., & Zhang, M. (2015). Rapeseed polysaccharides as prebiotics on growth and acidifying activity of probiotics in vitro. *Carbohydrate Polymers*, *125*, 232–240. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.040
23. Wichienchot, S., Jatupornpipat, M., & Rastall, R. a. (2010). *Oligosaccharides of pitaya* (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chemistry*, *120*(3), 850–857. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.026
24. Wichienchot, S., Thammarutwasik, P., Jongjareonrak, A., Chansuwan, W., Hmadhlu, P., Hongpattarakere, T., Itharat, A., & Ooraikul, B. (2011). Extraction and analysis of prebiotics from selected plants from southern Thailand. *Sonklanakarin Journal of Science and Technology*, *33*(5), 517.
25. Xie, J.-H., Liu, X., Shen, M. Y., Nie, S. P., Zhang, H., Li, C., Gong, D. M., & Xie, M. Y. (2013). Purification, physicochemical characterisation and anticancer activity of a polysaccharide from Cyclocarya paliurus leaves. *Food Chemistry*, *136*(3), 1453–1460. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.078

26. Zhu, J., Liu, W., Yu, J., Zou, S., Wang, J., Yao, W., & Gao, X. (2013). Characterization and hypoglycemic effect of a polysaccharide extracted from the fruit of Lycium barbarum L. *Carbohydrate Polymers*, *98*(1), 8–16. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.057
27. Zhu, W., Zhou, S., Liu, J., McLean, R. J. C., & Chu, W. (2020). Prebiotic, immuno-stimulating and gut microbiota-modulating effects of Lycium barbarum polysaccharide. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *121*, 109591. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109591